

## Diagnostica molecolare in Italia

P. Rizzotti

*Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore,  
Azienda Ospedaliera, Verona*

### Introduzione

La lettura di apertura del National Meeting della American Association for Clinical Chemistry (AACC) svoltosi ad Atlanta nel 1989 fu tenuta dal genetista inglese Robert Williamson con il significativo titolo "Molecular Genetics and the Transformation of Clinical Chemistry". Nel dicembre dello stesso anno la lettura fu pubblicata da Clinical Chemistry (1).

Con forte stimolo polemico, ma con significativa lungimiranza, l'autore sottolineava come la chimica clinica si trovasse già allora in una crisi di identità schiacciata fra il realizzarsi, da una parte delle prime grandi esperienze di automazione delle attività analitiche e dall'altra dal progredire della ricerca nell'ambito della genetica molecolare.

I grandi progressi analitici come le tecniche di amplificazione genica ed i metodi "high-sensitivity gene-detection" congiunti con la sempre migliore definizione sia delle patologie associate a difetti di singoli geni (distrofia muscolare di Duchenne, fibrosi cistica, emoglobinopatie, ecc.) come degli studi circa le basi molecolari della suscettibilità alle malattie complesse, avrebbero portato in un futuro non troppo lontano, sempre secondo il genetista inglese, all'allargamento delle ricerche molecolari non solo nei laboratori specialistici ma anche nei "laboratori tradizionali". A questo punto stava ai chimico-clinici rispondere a questa sfida stimolante, o meglio a questa opportunità, riorganizzando e riqualificando la propria attività.

Dalla fine degli anni 80, epoca dell'articolo di Williamson, i test molecolari hanno assunto ulteriore importanza sia nell'ambito di disordini monogenici di rilevante importanza clinica come l'ipercolesterolemia familiare (2) e l'emocromatosi (3) che nell'ambito dei disordini complessi come il cancro, le malattie cardiovascolari ed il diabete (4).

In assoluta contemporaneità abbiamo assistito ed assistiamo al continuo sviluppo di metodi di amplificazione del DNA, di strumentazioni di sequenzia-

mento altamente automatizzate ed in grado di fornire analisi quantitative delle molecole di acido nucleico contenute nel campione dei pazienti per non parlare della "highly parallel array techniques" (5). E' giusto sottolineare con Michael Neumaier dell'Università di Amburgo in Germania, come pochi test in laboratorio dispongano di un così impressionante armamentario tecnologico.

Alla luce di questi elementi possiamo sostenere che nel nostro paese la sfida lanciata alla fine degli anni 80 da Williamson abbia avuto riscontro e che la diagnostica molecolare sia diventata o stia diventando una parte importante del repertorio dei laboratori specializzati e non?

### Censimento dei test genetici in Italia - anno 2000

La Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) nata dalla fusione della Società Italiana di Citogenetica Medica e della Società Italiana di Genetica Medica ha curato un censimento dei test genetici in Italia nell'anno 2000 (6) comparando tali dati con precedenti esperienze di monitoraggio di tale attività specialistica.

Il censimento relativo ai test genetici si è svolto tra i mesi di marzo e settembre del 2001 utilizzando la via informatica con attività promozionali all'interno del 3° Congresso Nazionale della SIGU svoltosi ad Orvieto nel 2000. Il Prof. Dallapiccola ed i suoi collaboratori, che hanno svolta tale importante indagine, sottolineano nella presentazione dei risultati, che il censimento non si è posto l'obiettivo di svolgere controlli sulla qualità dei servizi e della diagnosi ma si è limitato a fotografare la quantità e la tipologia della domanda dei test genetici in Italia e a monitorizzare il cambiamento temporale delle tendenze.

Nella Tabella I è riportata la numerosità delle strutture e la suddivisione per tipologia di istituzione di appartenenza.

Il 37% dei laboratori che forniscono test di citogenetica e di genetica molecolare appartengono ad Aziende Ospedaliere o comunque ad Aziende sanitarie. La tipologia della strutture che forniscono tali

attività è comunque molto variegata: da strutture definite come Laboratorio di Malattie Genetiche e Metaboliche, a strutture inserite all'interno di strutture cliniche (es. U.O. di Ematologia ed Oncologia Pediatrica ecc.) a sezioni facenti riferimento a Dipartimenti di Medicina di Laboratorio.

Il 44% dei laboratori fa riferimento a strutture universitarie definite come accreditate per la loro forte integrazione con l'attività assistenziale, a strutture universitarie di ricerca ed a istituti di ricovero e cura a carattere scientifico (IRCCS). Infine una fetta non indifferente del 19% è rappresentata da strutture private accreditate e non.

E' da sottolineare comunque come all'interno delle 264 strutture censite, solo 124 svolgano test di genetica molecolare.

Nella Tab. II è riportata l'attività in termini di numero di indagini svolte da questi 124 laboratori.

Nel 2000 si è assistito ad un incremento dei test del 129.7% rispetto al 1997.

Tali strutture svolgono 254 diverse tipologie di indagini molecolari ed i test molecolari post-natali nel periodo 1997-2000 sono aumentati del 124.3%.

L'analisi molecolare più richiesta (19% di tutte le diagnosi) ha riguardato l'HLA, seconda è risultata l'analisi del gene CFTR (fibrosi cistica). Al terzo, quarto e quinto posto troviamo le analisi per l'iperomocisteinemia, per il deficit dei fattori V e II della coagulazione. E' facilmente intuibile la stretta connessione delle analisi correlate al rischio di trombosi con l'attività dei laboratori di analisi chimico-cliniche ed ematologiche.

Il censimento riporta numerosi altri dati tutti degni di discussione e di approfondimento; segnalo come dato interessante la situazione del personale impegnato in tale attività: nel 34% dei casi si tratta di non strutturati siano essi medici, biologi piuttosto che tecnici di laboratorio.

**Tabella I.** I laboratori di genetica (n° 264) operanti in Italia nel 2000 (società italiana di genetica umana)

aziende ospedaliere/aziende sanitarie	37%
università accreditate	20%
irccs	15%
università ricerca	9%
laboratori privati accreditati	10%
laboratori privati	9%

**Tabella II.** Indagini molecolari in Italia: confronto 1997-2000 (società italiana di genetica umana)

	1997	2000	
analisi molecolari	50.367	115.710	+129.7%
→ 254 tipologie di indagini molecolari			
→ diagnosi molecolari prenatali +233% (1997-2000)			
→ test molecolari post-natali +124.3% (1997-2000)			

## Aspetti di criticità ed ipotesi di lavoro

L'importante ed approfondita indagine condotta dalla SIGU, che ha anche la significativa caratteristica di potersi confrontare con indagini precedenti, dimostra, come sopra accennato, la grande eterogeneità delle strutture che oggi praticano la diagnostica molecolare in Italia. Tale eterogeneità risulterebbe ulteriormente ingrandita nel caso venissero censite anche le strutture che utilizzano tecniche di biologia molecolare per l'individuazione del genoma virale, piuttosto che di segnali molecolari provenienti da singole cellule tumorali.

Probabilmente la disomogeneità, sarebbe stata ancora più evidente se fossero stati indagati gli aspetti strutturali e qualitativi di tali attività.

Nel 1999 la International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) tramite la Scientific Division ed il Committee on Molecular Biology Techniques ha definito alcuni aspetti fondamentali riguardanti la valutazione della qualità dei metodi di amplificazione molecolare nella diagnostica clinica (7). Vengono dettagliatamente esposti aspetti riguardanti l'organizzazione del Laboratorio e le relative attrezzature, gli aspetti preanalitici, i fattori interferenti nelle procedure analitiche e le problematiche relative al controllo di qualità interno ed esterno.

Nel 1998 l'Advisory Committee del Clinical Laboratory Improvement Amendments 1988 (CLIA) negli Stati Uniti ha costituito uno specifico Genetic Testing Work Group che ha concluso che la legislazione americana relativa alle indagini di laboratorio doveva prevedere una specifica sezione relativa ai test genetici (8). Nel documento sviluppato dal gruppo di lavoro del CLIA si dà particolare importanza alla formazione ed alla qualità del personale impegnato in tale diagnostica, alla partecipazione a programmi di verifica esterna di qualità, agli aspetti relativi alla confidenzialità ed al consenso informato, alle specifiche problematiche relative alla refertazione soprattutto rispetto alla interpretazione dei risultati ed alla consulenza clinica.

La verifica della qualità di tale particolare attività diagnostica rappresenta un'altra problematica critica: dall'impostazione generale dei programmi di "proficiency" (organizzata per diagnostiche riguardanti singole situazioni patologiche o piuttosto per mettere in evidenza gli aspetti analitici più significativi del processo) al reperimento del materiale da inviare, alle strutture ed organizzazioni in grado di realizzarli. Una recente esperienza europea relativa alla diagnostica molecolare della fibrosi cistica in circa 150 laboratori ha evidenziato che il 62% dei laboratori ha commesso più di un errore nei tre anni dello studio (9).

Una recente ed interessante esperienza italiana di Claudia Casini Raggi e coll. (10) ha sviluppato una esperienza di verifica esterna di qualità (VEQ) rivolta a valutare diversi step analitici comuni alle inda-

gini molecolari tipo l'estrazione del DNA, la sua amplificazione e l'analisi del prodotto dopo PCR. A tale esperienza hanno partecipato 39 laboratori. Sulla base di uno score complessivo ottenuto da ogni laboratorio è stata stilata una valutazione qualitativa che indica come buone ed eccellenti 17 strutture su 39.

Gli aspetti di eterogeneità di appartenenza alle strutture, di precarietà di  $\frac{1}{3}$  del personale che vi opera, le problematiche evidenziate da esperienze preliminari di "proficiency" portano a pensare come necessaria ed utile una forte integrazione tra la realtà così evidenziata relativa alle strutture che eseguono indagini molecolari e l'attività dei laboratori istituzionali.

Peraltro il mondo dei laboratori tradizionali, alla luce delle problematiche relative alla scarsità delle risorse finanziarie disponibili per la sanità nel nostro paese, sta vivendo un periodo di riorganizzazione che vede forti disomogeneità a seconda delle regioni del nostro paese, a seconda delle forze culturali possedute dal mondo della professione del laboratorio ed a seconda dell'intelligenza degli amministratori coinvolti. Una forte integrazione tra l'esperienza delle strutture coinvolte nelle indagini molecolari e le strutture dei laboratori istituzionali è probabilmente una via importante per omogeneizzare le virtù dei due oggi diversificati ambienti.

Alla luce del contesto economico sopra definito saranno reperibili risorse economiche ed umane anche da una conversione ragionata, basata su obiettivi clinici, dell'attività dei laboratori istituzionali. L'ambito della diagnostica molecolare rappresenta sicuramente uno degli obiettivi clinici di revisione di tale attività pronta ad integrare ulteriormente l'orizzonte al "post genoma" con l'analisi dell'assetto delle proteine (proteoma) e la valutazione degli aspetti intermedi delle vie metaboliche (metaboloma).

## Bibliografia

1. Williamson R. Molecular genetics and the transformation of Clinical Chemistry. *Clin Chem* 1989;35:2165-8.
2. Baron H, Fung S, Aydin A, Bahring S, Luft FCM, Schuster H. Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Nat Biotechnol* 1996;14:1279-82.
3. Niederau C, Strohmeyer G. Strategies for early diagnosis of haemochromatosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14: 217-21.
4. Ferns G AA, O'Dowd D, Wark G, Collins N. Molecular diagnostics in routine practice: quality issues and application to complex disease. *Ann Clin Biochem* 2003;40:309-12.
5. Neumaier M, Braun A, Gessner R, Funke H. Experiences with external quality assessment (EQA) in molecular diagnostics in clinical laboratories in Germany Working Group of the German Society for Clinical Chemistry (DGKC) and Laboratory Medicine (DGLM). *Clin Chem Lab Med* 200;38:161-3.
6. Dallapiccola B, Torrente I, Mari A, Migarelli R. Censimento dei test genetici in Italia Anno 2000. *Analysis* 2002;5/6:292-360.
7. Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnosis. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem* 1998;44:12-26.
8. Schwartz MK. Genetic testing and the clinical laboratory improvement amendments of 1988: present and future. *Clin Chem* 1999;45:739-45.
9. Dequeker EM, Cassiman J-J. Genetic testing and quality control in diagnostic laboratories. *Nat Genet* 2000;25:259-60.
10. Casini Raggi C, Pinzani P, Paradiso A, Pazzagli M, Orlando C. External quality assurance program for PCR amplification of genomic DNA: an Italian experience. *Clin Chem* 2003;49:782-9.